

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
(Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling)

HLA-Typisierung von Blutspuren

Untersuchungen mit einer Absorptionsmethode
und zwei Absorptions-Elutionsmethoden

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Bernhard Hofmann
aus Geiselbach

1983

1983 # 156



Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
(Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling)

HLA-Typisierung von Blutspuren

Untersuchungen mit einer Absorptionsmethode
und zwei Absorptions-Elutionsmethoden

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Bernhard Hofmann
aus Geiselbach

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. V. Becker

Referent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 09.05.1983

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
1.1.	Problemstellung	3
2.	Material und Methoden	4
2.1.	NIH-Standard-Lymphozytotoxizitätstest	4
2.1.1.	Testprinzip	4
2.2.	Lymphozytotoxizitätstest (NIH) - Arbeitsanleitung	5
2.2.1.	Material	5
2.2.2.	Lymphozytengewinnung	5
2.2.3.	Lymphozytotoxische Reaktion	10
2.2.4.	Ablesen und Bewertung	10
2.3.	Allgemeine Überlegungen zur Durchführung des Absorptionstests und der Absorptions- Elutionsmethoden für die Untersuchung von Blutspuren	11
2.3.1.	Absorptionstest	11
2.3.2.	Absorptions-Elutionstest	12
2.4.	Vorversuche mit den Anti-HLA-Seren	16
2.4.1.	Auswahl der Anti-HLA-Seren für die Absorptions-Elutionsmethoden	16
2.4.2.	Thermische Elution	16
2.4.3.	Säureelution	17
2.4.4.	Absorptionsmethode	17
2.4.5.	Titrationsserien	17
2.4.6.	Testzellen und Komplement	18
2.5.	Blutspuren	20
2.6.	Durchführung der Untersuchungen	22
2.6.1.	Absorptionstest	22
2.6.2.	Absorptions-Elutionstest, thermisch	22
2.6.3.	Absorptions-Elutionstest, Säure	23
2.6.4.	Ablesen	24
3.	Ergebnisse	25
4.	Diskussion	32
5.	Zusammenfassung	34
6.	Literatur	37



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546202_0095

1. Einleitung

Nachdem LANDSTEINER im Jahre 1901 die ABO-Blutgruppen entdeckt hatte, stellte er bereits zwei Jahre später erste Überlegungen an, wie die Serumeigenschaften des menschlichen Blutes zur Individualisierung von Blutspuren zu verwenden wären. Erst LATTES (1926) aber gelang es, eine Methode zur sicheren Bestimmung der Serumeigenschaften Anti-A und Anti-B an Blutspuren zu entwickeln.

HOLZER (1931) beschrieb dann als erster einen Absorptionstest zur Bestimmung der Blutgruppeneigenschaften des ABO-Systems an Blutspuren. Dieser Test wird auch heute noch angewandt. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Methoden zur Blutgruppenuntersuchung an Spuren ausgearbeitet und verbessert. Inzwischen sind die Eigenschaften des ABO-Systems auch an sehr geringen Spurenmengen nachweisbar (Absorptions-Elutionsmethode); weiterhin können die Gm- und InV-Eigenschaften sicher nachgewiesen werden (JORCH und OEPEN, 1977). Über die Bestimmung des MN-Systems, des Rh-Systems und auch einiger erythrozytärer Enzymmerkmale an Blutspuren liegen Untersuchungen vor (PEREIRA, 1963; HOWARD, 1969; BRINKMANN, 1972; ROTHWELL, 1974; HAYWARD, 1975; SCHWERD, 1977; MARTIN, 1977; HUMMEL, 1977 und MISCICKA, 1977).

Eine weitaus bessere Differenzierung von Blutspuren als mit den bislang verwendeten Systemen wäre aber mit dem HLA-System möglich, da dieses System einen Polymorphismus hat, den kein anderes bisher bekanntes Blutgruppensystem auch nur annähernd aufweist. Unter 500 unverwandten Personen findet man im Durchschnitt nur zwei mit den gleichen Merkmalen des A- und B-Locus.



Das Gewebeantigensystem (abgekürzt HLA-System) wurde anlässlich eines Transfusionszwischenfalles von DAUSSET entdeckt und im Zusammenhang mit den Forschungen über die Gewebeverträglichkeit bei Organtransplantationen in den letzten 15 Jahren näher untersucht. Auf Chromosom Nr. 6 wurden bislang vier eng gekoppelte Genorte mit multipler Allelie gefunden. Auf dem A-Locus sind bisher 19 Antigene, auf dem B-Locus 42 Antigene, auf dem C-Locus 8 Antigene und auf dem DR-Locus 10 Antigene serologisch definiert worden (WHO-Report, 8th Workshop, 1980). Beschränkt man sich auf den A- und B-Locus, so besitzt der Mensch jeweils zwei gekoppelt vererbte Merkmale, die zusammen auch als Haplotypus bezeichnet werden. Ein Haplotypus (z.B. A3, B7) stammt von der Mutter, der andere (z.B. A9, B12) vom Vater. Da die Merkmale des A- und B-Locus in beliebiger Weise gekoppelt sein können, ergibt sich eine sehr große Zahl möglicher Phänotypen.

RITTNER und WAIYAWUTH waren die ersten, die 1974 und 1975 über Absorptionsuntersuchungen von Anti-HLA-Seren mit Blutspurenextrakten berichteten.

Erst vier Jahre später veröffentlichten zwei weitere Autoren, HODGE et al. (1979) sowie NEWALL (1979) ihre Ergebnisse über einen Absorptionstest zum Nachweis der Antigene HLA-A1, -A2 und -B5 an Blutspuren. Ihre Untersuchungsmethoden unterschieden sich nur unwesentlich, obwohl sie unabhängig voneinander entwickelt worden waren. Somit erschien es sinnvoll, die Arbeitsvorschriften der Autoren weitgehend unverändert zu übernehmen und die Untersuchungen auf weitere HLA-Antigene auszu-dehnen.

In einer ersten Studie (DÖRR, 1982) konnten die Antigene HLA-A1, -A3, -A9, -E7 und -B8 zu über 90 % richtig bestimmt werden; in weiteren Untersuchungen war die Richtigkeit der HLA-Typisierung von Blutspuren unter günstigen Bedingungen auf über 95 % zu steigern (KUTZ, 1982).

Um die Absorptionsmethode zur Bestimmung der HLA-Antigene in Blutspuren noch weiter zu verbessern, wäre jedoch ein sehr großer Aufwand notwendig gewesen. Deshalb sollte überprüft werden, ob nicht durch ein Absorptions-Elutionsverfahren, das sich bei der Bestimmung der ABO-Blutgruppen von Blutspuren inzwischen eingebürgert hat (NICKOLLS und PEREIRA, 1972), auch bei der HLA-Typisierung von Blutspuren noch bessere Ergebnisse erzielt werden könnten.

1.1. Problemstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit sollte sein, geeignete Absorptions-Elutionsmethoden für die HLA-Bestimmung an Blutspuren zu entwickeln und in einer Versuchsreihe mit 50 Blutspuren diese Methoden mit der Absorptionsmethode (KUTZ, 1982) zu vergleichen.

Um den Arbeitsaufwand überschaubar zu halten, sollten die Untersuchungen auf die HLA-Antigene A2 und B8 beschränkt bleiben, welche mit jeweils 4 verschiedenen Antiseren ausgetestet werden sollten.

2. Material und Methoden

2.1. NIH-Standard-Lymphozytotoxizitätstest

Mit diesem Test wurden die Spender der Blutspuren HLA-typisiert.

2.1.1. Testprinzip

HLA-Antigene sind auf fast allen Zellen des Körpers nachweisbar. Zur Untersuchung der HLA-Merkmale sind Lymphozyten besonders gut geeignet. Sie werden aus Nativblut über einem Medium mit definierter Dichte (Ficoll Isopaque) isoliert und zunächst mit Anti-HLA-Seren und später mit Kaninchenkomplement zusammengebracht. Wenn die Lymphozyten das HLA-Merkmal tragen, gegen das der Antikörper des Testserums gerichtet ist, bildet sich ein Antigen-Antikörperkomplex. Dieser aktiviert Komplement, welches dann die Zellmembran der Lymphozyten schädigt: es erfolgt eine zytotoxische Reaktion.

Um die abgetöteten Lymphozyten sichtbar zu machen, gibt man den Vitalfarbstoff Eosin zu, der nur von geschädigten Zellen aufgenommen wird. Nach dem Färben erkennt man die zytotoxisch veränderten Lymphozyten im Phasenkontrastmikroskop als gefärbt, groß und dunkel, während die "lebenden" Lymphozyten als ungefärbt, kleiner und stärker lichtbrechend erscheinen. Die Ablesung erfolgt aus technischen Gründen im umgekehrten Phasenkontrastmikroskop.

2.2. Lymphozytotoxizitätstest (NIH) *) - Arbeitsanleitung

2.2.1. Material

- a) Anti-HLA-Seren
- b) Anti-Lymphozytenserum (Positivkontrolle)
- c) AB-Serum, antikörperfrei (Leerwertkontrolle)
- d) Kaninchenkomplement
- e) Hanks Solution
- f) Lymphoflot (Dichtemedium zur Isolierung der Lymphozyten)
- g) Eosin 6 % in H_2O
- h) Formaldehyd 37 %, säurefrei, filtriert
- i) Mikrotestkammer mit 60 Nüpfchen
- j) Mineralöl
- k) Umgekehrtes Mikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung
- l) Mikroliterspritzen (Hamilton)
- m) Deckgläser

Da bei der HLA-Typisierung häufig Kreuzreaktionen vorkommen, müssen zur Testung eines Hla-Antigens stets mehrere verschiedene Testseren eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Routinetestung die in Tabelle 1 a - c angegebenen Antiseren verwendet.

2.2 2. Lymphozytengewinnung

a) Blutentnahme

Ca. 10-20 ml Venenblut werden sofort nach Entnahme in einen Erlenmeyerkolben gegeben, der ca. 20 Glasperlen mit einem Durchmesser von 4 mm enthält. Durch

*) NIH = National Institute of Health

Tabelle 1a: Für die Routinetypisierung verwendeter
Testserenansatz. A-Locus

1: Anti			1: Anti		
1. a)	Wü 1035	1 A1	6. a)	Barletta Tü 5/79	1 A25+E27
b)	Leschhorn Bad	1 A1	b)	Bio. 2060	1 A25
c)	Schreiber Wi 2/80	2 A1	c)	Bea. 7028	1 A25
d)	Fres. Test 7291	1 A1	d)	KN 3076 III	1 A26
e)	Wü 265620	1 A1+B27+w47	e)	Be. 22602	1 A26
f)	Rudolf Wi 11/78	1,5 A1+26	f)	Fres. 2346	1 A26
2. a)	Schwab Bad	1 A2	7. a)	Fres. Test 7089	1 A11
b)	Haydter Wi 2/78	1 A2	b)	KN 6445	1 A11
c)	Auenh. Wi 680572	1 A2	c)	Kiel E 7004	1 A11
d)	Wü 9166956	1 A2	d)	Be. 1103	1 A11
e)	Be. 8103	1 A2+28	e)	Bio. 2020	1 A11
f)	Han 6/76	1 A2+28	f)	Han 15/78	1 A11+1
3. a)	Wolf Tü 41/80	1 A3	8. a)	Kühnböck Wi 10/76	1 A28
b)	Wü 153403	1 A3	b)	Mer. 0485	1 A28
c)	Amschl Wi 10/78	1 A3	c)	Wü 519050	1 A28
d)	Gruber Tü	1 A3schw.	d)	Kiel II 104	1 A28
e)	Bartes Wi 6/78	1 A9	e)	Fres. 7042	1 A29
f)	Han 94/76	1 A9	f)	Ulm 11041	1 A29
4. a)	Wü 21556	1 A9	9. a)	Rieger Tü 4/79	1 A29
b)	Miksat Tü 7/80	2 Aw23	b)	KN 296002	1 A29
c)	Wü 224613	1 Aw23	c)	Be. 1901	1 A29+w30+w31
d)	Mer. 0612	1 Aw23	d)	Kiel C 4419/2	1 Aw30+w31
e)	Rauer Wi 2/77	1,5 Aw24+23s	e)	KN 4282	2 Aw30+w31
f)	Mer. 0147	2,5 Aw24+1s	f)	FfM	1 Aw30+w31+B13
5. a)	Kain Tü 6/79	1,5 Aw24+Bw22ev. +	10. a)	Machinek Tü 5/72	1 Aw32
b)	Bio. 7029/042	1 Aw24s+Cw2	b)	Bechtele Tü 12/71	1 Aw32+25s
c)	KN 5685	1 A10	c)	Wü 902082	1 Aw32+25
d)	Fres. 70693	2 A10	d)	Be. 86022	1 Aw32+25
e)	Wü 907871	1 A10	e)	Han 9/78	1 Aw32+10
f)	Pulz Tü 2/79	1 A25	f)	Han 7/78	1 Aw32+10

Tabelle 1b: Für die Routinetypisierung verwendeter
Testserenansatz. A-Locus und B-Locus

1: Anti				1: Anti			
1.	a)	Lohner Wi 5/72	1 Aw33+w32+w31+w30+29+10	6.	a)	Bio. 1020	1 B13
	b)	FfM	1 Aw33+w31+w30+29+11+3		b)	Moyer Wi 3/74	1 B14
	c)	Ostermayer Wi 10/78	1 Aw34+10		c)	Kinzl Wi 11/76	1 E14
	d)	Fres. Test 70671	1 Aw34+10		d)	Pio 2010	1 E14
	e)	Grahn Tü 6/79	3 Aw34+10		e)	Frysak Wi 3/77	1 B14+18s
	f)	Zand Wi 613671	1 Aw34+11+10+1		f)	Reeh Wi 9/65	1 E14+18
2.	a)	KN 5849	2 Bw51	7.	a)	Pe. 1502 E	1 E15
	b)	Wü 520292	1 B5		b)	Pio. 3050	1 E15
	c)	Wü 153570/79	1 B5		c)	Bleher Tü 3/79	2 E15
	d)	Porkistl Wi 3/77	1,5 B5 ev. +		d)	Wü 822485	1 E15
	e)	Han 3/79	1 B5		e)	Han 27/78	1 E15
	f)	Aschbr. Wi 10/75	1 B5+w53		f)	Marekow. Tü 3/72	6 E15
3.	a)	Wü 150316	1 E7	8.	a)	Pakd11 Tü 2/79	1 B16
	b)	Ulm 4890	1 E7		b)	Tamuts. Tü 5/72	2 B16
	c)	Han 436/261	1 E7		c)	Han 13/78	1 B16
	d)	KN 2773	1 E7		d)	Kiel F 19/75	1 E16
	e)	Fres. Test 7088	1 E7		e)	Wü 950 110	1 B16
	f)	Huber Wi 3/77	1 E8		f)	Pe 8901	1 E16+14+18
4.	a)	Lader Wi w5748	1 B8	9.	a)	Deutsch Wi 3/77	1 Ew38+5s
	b)	Öller Wi 6/78	1 B8		b)	Ulm 09648	1 Ew38
	c)	Wü 516942	1 B8		c)	Frei 2025	1 Ew39
	d)	Heigl Wi 975094	1 B12		d)	Hbg. 240178	1 Ew39+
	e)	Karnik Wi 5/71	1 B12		e)	Vetterer Tü 4/80	1 B17
	f)	Giessen S11370 II	1 B12		f)	Ead 79011	1 B17
5.	a)	Giessen 2B/73	1 E12	10.	a)	G8 114280 B	1 E17
	b)	Vogler Tü 3/80	1 E12		b)	Pio. 3030	1 E17
	c)	Wagner-Lö. Wi 3/73	1 B13		c)	Pe. 1704 D	1 E17
	d)	Andretter Wi 6/69	1 B13		d)	Pilotto Th 5/79	3 E18
	e)	Hager Wi 1/74	1 B13		e)	Hbg. 171177	1 E18
	f)	Hlozek Wi 558125	1 E13		f)	Pe. 1802 A	1 E18

Tabelle 1c: Für die Routinetypisierung verwendeter
Testserenansatz. B-Locus und C-Locus

1: Anti			1: Anti		
1.	a) Fres. 7064	1 B18	6.	a) Be.3703	1 B37
	b) Fres. 2687	1 Ew21		b) Bio	1 B37
	c) Be. 2105 C	1 Ew21		c) Villani Tü 3/80	2 B37
	d) Bio 30/70	1 Ew21		d) Wu 950024	1 B40
	e) Mer 552	1 Ew21		e) Wu 950118	1 B40
	f) G8 2601/79	1 Ew21		f) Han 14/78	1 B40
2.	a) Bauer, F. Wi	1 Ew49	7.	a) Fres.Test 7090	1 B40
	b) Bissinger Tü 5/72	3 Ew49		b) Fres.Test 2626	1 B40
	c) Fres.Test 7086	1 Ew49		c) Kiel B7651	1 Bw41+40
	d) Kraber Wi ws279	1 Ew50		d) Mer. 615	1 Bw41+40+
	e) Steinh. Tü 4/72	2 Ew50+w49s		e) Honner Wi655293	1 Bw41+40+13+w21s
	f) Petery Tü 4/79	1 Ew22		f) Edelmann Wu	1 Bw41+40+13+7
3.	a) Hoffmann Tü 6/72	1 Ew22	8.	a) Luttinger Pool	1.5 Cw2
	b) Bio 8050	1 Ew22		b) Euckenm. Tü2/79	16 Cw2
	c) Mer. 444	1 Ew22		c) Be. 5202	1 Cw2
	d) Han 21/77	1 Ew22		d) Fres.Test 70623	3 Cw2
	e) Fres.Test 651	1 Ew22		e) Vatter Tü 1972	2 Cw3
	f) Fres.Test 653	1 Ew22		f) Blacik Wi 1/78	1 Cw3
4.	a) Bio 1070	1 B27	9.	a) Spiegler Wi	1 Cw3+Bw60+7
	b) Bio 5050	1 B27		b) Furlinger Tü	1 Cw4
	c) G8 1042/80 C	1 B27		c) Schlösser Tü10/79	1 Cw4
	d) KN 32/79	1 B27		d) Be. 5403	1 Cw4
	e) Moormann Wi 2/76	1 B27+7		e) Be. 5402	1 Cw4
	f) Mer. 0302	1 Ew35+Cw4		f) Tremi ws282 Wi	1 Cw5+B12s
5.	a) Annerl Pool IIWi	1 Ew35	10.	a) Fres.Test 7082	1 Cw5
	b) Hbg. 250/978	1 Ew35+Cw4		b) Hartmann Tü5/79	2 Cw7
	c) Euck Tü 3/72	1 Ew35		c) Wu Simoneit I	1 Bw49?
	d) Kriegs Tü 6/72	2 Ew35		d) Wu Merk I	1 Bw15?
	e) Woschn. Wi 559196	1 Ew35+5s		e) neg.Kontrolle	
	f) Wu 801437	1 Ew35+18+5		f)	

gleichmäßiges Schütteln während 10-15 min wird das Blut defibriniert. Dann wird das Koagel entfernt.

b) Isolieren der Lymphozyten

In ein 12-ml-Reagenzglas werden 5 ml Lymphoflot vorgelegt und vorsichtig mit 5 ml defibriniertem Blut überschichtet. Dann wird 20 min lang bei 1500 g zentrifugiert. Die Lymphozyten befinden sich dann als weißlicher Ring an der Grenze zwischen Plasma und Lymphoflot. Diese Schicht wird vorsichtig in ein anderes Reagenzglas überführt, dann wird mit Hanks Lösung aufgefüllt.

c) Waschen der Lymphozyten

Die Lymphozyten suspension wird bei 1000 g 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird fast vollständig abgesaugt und das Lymphozytensediment resuspendiert. Dann wird erneut mit Hanks Lösung aufgefüllt und der Waschvorgang noch zweimal wiederholt.

d) Einstellen der Lymphozytenzahl

Durch Verdünnen mit Hanks Lösung wird die Lymphozytensuspension so eingestellt, daß in der Zählkammer eine Zellzahl von ca. 2000 Zellen pro μ l vorliegt.

2.2.3. Lymphozytotoxische Reaktion

- a) In die 60 Nöpfchen der Mikrotestkammer je einen Tropfen Mineralöl füllen.
- b) In jedes Nöpfchen mittels Mikroliterspritze oder Automat 1 μ l Antiserum einbringen. Im allgemeinen wird mit bis dahin vorbereiteten, tiefgekühlten Mikrotestplatten gearbeitet, und der nun folgende Punkt c) steht am Anfang der Routineuntersuchung.
- c) Zu den Antiseren je 1 μ l Lymphozytensuspension geben. 30 min bei 23° C inkubieren.
- d) Zugabe von je 5 μ l Kaninchenkomplement. 60 min bei 23° C inkubieren.
- e) Zugabe von je 3 μ l Eosin.
- f) 10 min später Einbringen von je 9 μ l 37 %-igem Formaldehyd mit einem pH von 7,2.
- g) Auflegen des Deckglasses.
- h) Nach etwa einer Stunde sind die Lymphozyten sedimentiert und es kann die Ablesung der Testplatten erfolgen. Durch die Fixierung mit Formaldehyd ist es möglich, die Reaktionen noch über einen Zeitraum von 4-6 Tagen hinaus zu bewerten, wenn die Testplatten bei 4° C aufbewahrt werden.

2.2.4. Ablesen und Bewertung

Die Reaktionen in den Nöpfchen der Mikrotestplatten werden im umgekehrten Phasenkontrastmikroskop abgelesen. Die zytotxisch veränderten Lymphozyten erscheinen dunkel und groß; die "lebenden" Zellen sind hell, etwas kleiner und leuchtend.

Bewertet wird durch Angabe des Anteils an toten Zellen im Nöpfchen:

Getötete Zellen in %	Bewertungsstufe
0 - 10	1
10 - 25	2
25 - 50	3
50 - 80	4
80 - 100	5

Als positiv wird eine Reaktion dann gewertet, wenn mehr als 50 % der Zellen abgetötet worden sind.

2.3. Allgemeine Überlegungen zur Durchführung des Absorptionstests und der Absorptions-Eutionsmethoden für die Untersuchung von Blutspuren

2.3.1. Absorptionstest

Der Absorptionstest beruht auf folgendem Prinzip: Das Antigen in Form einer Blutspur wird dem Antiserum zugegeben. An den Antigendeterminanten der Spur kommt es dann zur Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen. Entfernt man die Spur aus dem Antiserum, so werden auch die an ihr gebundenen Antikörpermoleküle mit herausgenommen; der Titer des Antiserums ist reduziert worden. Beim Austitrieren des ursprünglich eingesetzten und des mit der Spur absorbierten Antiserums kann diese Titerreduktion festgestellt werden.

Am günstigsten wird der Titer des Antiserums für den Absorptionstest so gewählt, daß bei der Absorption durch die Spur eine Titerreduktion um mehrere Stufen erfolgt oder daß der Antikörper vollständig absorbiert wird. Andererseits muß jedoch auch beachtet werden, daß der Spurenträger eine unspezifische Absorption von Antiserum hervorrufen kann.

Da das Spurenmaterial meist nur in begrenzter Menge zur Verfügung steht, muß der Absorptionstest so ausgelegt werden, daß er mit möglichst geringen Blutspurenmengen durchführbar ist. Das Indikatorsystem (= Testlymphozyten, die das entsprechende Antigen tragen) sollte bei Nichtvorliegen des Antigens auf der Spur noch vollständig anzeigen (im Idealfall wären 100 % der Testlymphozyten zytotoxisch verändert), während bei Vorliegen des entsprechenden Antigens so viel Antikörper aus dem Serum absorbiert werden sollte, daß die Testzellen nicht mehr oder nur noch sehr schwach anzeigen. Aus diesem Grund sind die HLA-Antisera für den Absorptionstest auf die entsprechenden Testlymphozyten so auszutitrieren, daß gerade noch ein Titer von 1:1 vorliegt.

In Abbildung 1 ist das Prinzip des Absorptionstests veranschaulicht.

2.3.2. Absorptions-Elutionstest

Auch beim Absorptions-Elutionstest wird das Antigen in Form einer Blutspur dem Antiserum zugegeben. An den Antigendeterminanten kommt es zur Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen. Das überschüssige Antiserum wird entfernt und die Spur mehrfach gewaschen.

Die an den Antigenen angelagerten Antikörper müssen nun eluiert werden. Dazu sind verschiedene Verfahren möglich; man kann z.B. durch Erwärmen die Affinität des Antikörpers zum Antigen verringern (thermische Elution) oder durch Zugabe von schwachen Säuren die Antikörper von den Antigenen absprenge.

Absorptions-Test (Spur trägt Antigen)

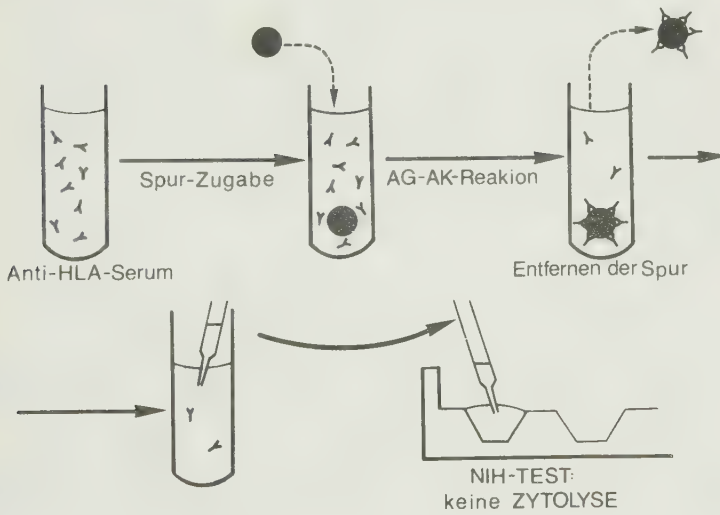


Abbildung 1 : Prinzip des Absorptionstests

Dazu wird nach dem Waschvorgang eine geringe Menge Flüssigkeit zur Spur gegeben. Dann wird der Antikörper entweder im Wasserbad bei 56° C oder 62° C thermisch oder bei Zimmertemperatur nach Säurezugabe eluiert. Nun wird die Spur aus der Flüssigkeit mit den eluierten Antikörpern entfernt, und nach Einstellung des pH auf 7,2 bzw. nach Einstellung der richtigen Temperatur, kann getestet werden, ob sich Antikörper im Eluat befinden. Trägt die Blutspur das Antigen, welches untersucht werden soll, so wird sie zunächst Antikörper anlagern, die dann beim Elutionsvorgang abgesprengt werden. Diese Antikörper können mit entsprechenden Testlymphozyten nachgewiesen werden.

Bei einem Absorptions-Elutionstest ist darauf zu achten, daß von der Spur so viele Antikörper absorbiert und dann wieder eluiert werden, daß das Indikatorsystem (die Testlymphozyten) bei Vorliegen des Antigens möglichst vollständig anzeigt, während eine unspezifische Absorption nur eine geringe Rolle spielen darf. Der Titer der Antiseren ist so hoch zu wählen, daß eine möglichst vollständige Absättigung der Antigendeterminanten der Spur erfolgen kann; er darf jedoch nicht so hoch sein, daß eine wesentliche unspezifische Absorption eintritt.

Das Prinzip des Absorptions-Elutionstests ist in Abbildung 2 dargestellt.

Absorptions-Elutions-Test (Spur trägt Antigen)

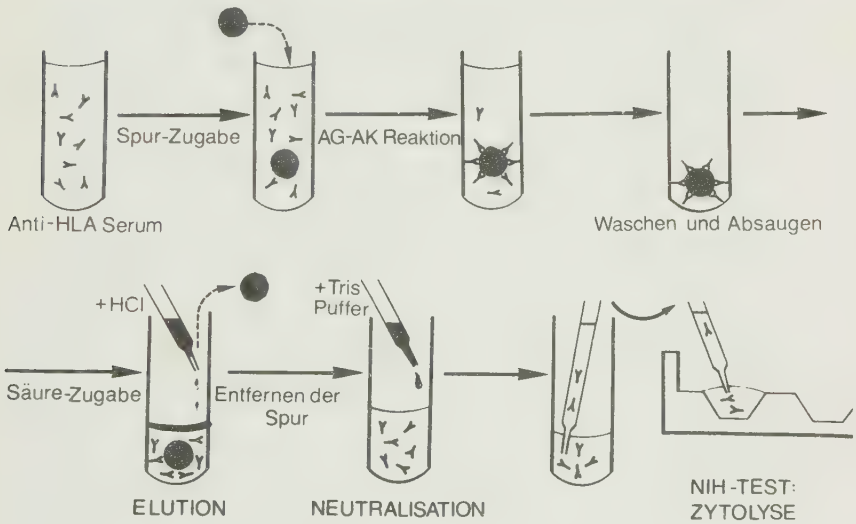


Abbildung 2 : Prinzip des Absorptions-Elutionstests

2.4. Vorversuche mit den Anti-HLA-Seren

2.4.1. Auswahl der Anti-HLA-Seren für die Absorptions- Elutionsmethoden

Bei der Auswahl der Anti-HLA-Seren war darauf zu achten, daß die chemischen und thermischen Einwirkungen, welche zur Abspaltung der Antikörper notwendig sind, nicht zur Denaturierung des Serumeiweisses und damit zur Inaktivierung der Seren führen würden. Mit den HLA-Seren sollten häufig vorkommende und leicht nachweisbare HLA-Antigene untersucht werden. Die Untersuchungen sollten deshalb auf zwei HLA-Antigene beschränkt bleiben, da zunächst nur ein Methodenvergleich vorgesehen war und eine Ausweitung der Untersuchungen auf viele HLA-Antigene zu aufwendig gewesen wäre. Es wurden auch solche HLA-Antigene ausgesucht, für die stets ein Spender mit den entsprechenden Testlymphozyten zur Verfügung stand.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb nur die Antigene HLA-A2 und HLA-B8 untersucht. Aus einer größeren Zahl von Antiseren wurden acht ausgewählt, die den unter 2.4.2. und 2.4.3. gestellten Anforderungen entsprachen.

2.4.2. Thermische Elution

Die thermische Elution der Anti-A- und Anti-B-Antikörper wird bei 56° C durchgeführt (NICKOLLS und PEREIRA, 1962). Bei HLA-Antikörpern handelt es sich überwiegend um inkomplette Antikörper (Antikörper der Klasse IgG), welche nach LINCOLN (1979) am vollständigsten bei einer Temperatur von 60° - 65° C eluiert werden. Bei den Vorversuchen wurde eine Temperatur von 62° C gewählt, bei welcher überprüft wurde, ob bei den später einzusetzen den HLA-Seren nach Inkubation für 60 min ein Titerverlust eintreten würde.

2.4.3. Säureelution

Die Säureelution sollte nach der von MUELLER-ECKHARD (1972) angegebenen Methode durchgeführt werden. Die Autorin konnte bei Absorption von HLA-Antisera mit Thrombozyten und anschließender Elution in geringem Volumen im Eluat eine vierfach höhere Antikörper-Konzentration wie im ursprünglich verwendeten Serum erzielen. Sie hatte die Säureelution bei einem pH von 3 durchgeführt.

Bei den später einzusetzenden Seren wurde deshalb überprüft, ob bei ihnen eine Einstellung auf pH 3 für 10 min mit anschließender Neutralisierung eine Titeränderung bewirken würde.

2.4.4. Absorptionsmethode

Zur Bestimmung der Verdünnung, bei welcher die später im Absorptionstest eingesetzte Zahl von Testlymphozyten noch zwischen 90 und 100 % lysiert würden, wurden ebenfalls entsprechende Titrationsreihen angesetzt.

2.4.5. Titrationsserien

Um die Titer der Antisera für den Absorptionstest und ihren Titer nach Säure- bzw. Wärmebehandlung festzustellen, wurden mit einem Hanks-Tris-Gemisch Verdünnungsreihen hergestellt. Der Zytotoxizitätstest wurde bei einer Verdünnung von 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8 und 1:12 durchgeführt. Für die thermische Exposition wurde eine Temperatur von 62° C für 60 min gewählt. Bei der Säureexposition wurden zu 1 µl Serum 0,5 µl HCl mit pH 2,9 gegeben und nach einer Inkubationszeit von

10 min mit 0,5 µl Hanks-Tris Pufferlösung (1:1) auf pH 7,4 gepuffert. Die geringste Verdünnung des Antiserums für die Säureexposition war deswegen 1:2.

Die Titer der Seren nach Säurebehandlung, welche teilweise niedriger als 1:2 liegen, wurden durch Vergleich mit der Reaktionsstärke nach thermischer Exposition ermittelt. Zeigte z.B. ein Serum bei Titer 1:2 sowohl nach thermischer als auch nach Säureexposition eine Zytolyse von 70 %, bei einem Titer von 1:1,5 bei der thermischen Exposition jedoch noch praktisch 100 % Zytolyse, so wurde davon ausgegangen, daß auch nach Säureexposition bei diesem Serum ein entsprechender Titer vorgelegen hätte.

Für die Untersuchungen wurden zu jeweils 1 µl Antiserum zwischen 1000 und 1500 Lymphozyten gegeben. Die Antigen-Antikörper-Inkubationszeit betrug 30 min, die Komplementinkubationszeit 60 min. Alle Reaktionen wurden bei einer Temperatur von 23° C ausgeführt.

In Tabelle 2 sind die bei den Untersuchungen gefundenen Titer angegeben (Mittelwerte aus jeweils 3 Untersuchungen).

2.4.6. Testzellen und Komplement

Die Testzellen stammten während der Vorversuche und während der anschließenden Untersuchungen von einem gesunden Spender mit dem HLA-Typ HLA-A2, -A3, -B8, -B15 und wurden nach der Methode 2.2.2. isoliert und während der ersten sechs Stunden nach Blutentnahme verwendet. Die Zellen wurden in einer Mischung aus Hanks-Lösung und Trispuffer aufbewahrt.

Tabelle 2: Titer der Antiseren im NIH-Test und nach Wärme- und Säurebehandlung mit Angabe der Gebrauchsverdünnung bei den verschiedenen Testverfahren

	NIH-Test		nach Exposition von		Verdünnung für		Absorptions- elutions- methoden
	100 %	50 %	Wärme	Säure	Wärme	Säure	
	Zytolyse bei Titer	Zytolyse bei Titer	Zytolyse bei Titer	Zytolyse bei Titer	Absorptions- methode	Absorptions- elutions- methoden	
Spezifität IILA-A2							
Hayter Wien	1 : 1,5	1 : 3	1 : 1,5	1 : 1,5	1 : 2	1 : 1	
Schwab	1 : 1	1 : 3	1 : 1	1 : 1	1 : 1,2	1 : 1	
Würzburg 506 780	1 : 1,5	1 : 4	1 : 1,5	1 : 1,5	1 : 2	1 : 1	
Würzburg 112 965	1 : 1	1 : 2	1 : 1	1 : 1	1 : 1,2	1 : 1	
Spezifität HLA-B8							
Gelbmann 388/3	1 : 2	1 : 4	1 : 2	1 : 2	1 : 2,5	1 : 1	
Ulm 4019,8	1 : 2,5	1 : 4	1 : 2	1 : 2	1 : 3	1 : 1	
Huber 3/77	1 : 2	1 : 4	1 : 1	1 : 2	1 : 2,5	1 : 1	
Ulm 2240	1 : 1,5	1 : 2,5	1 : 1	1 : 1	1 : 2	1 : 1	

Das Komplement stammte aus einem Serumpool von Kaninchen, welche im Alter von drei bis vier Monaten geschlachtet worden waren. Für die Vorversuche und die eigentlichen Versuche wurde die gleiche Komplementcharge verwendet, die portioniert in flüssigem Stickstoff aufbewahrt worden war.

2.5. Blutspuren

Von 50 gesunden Blutspendern wurden ungeronnene Venenblutproben auf Baumwolläppchen getropft. Die Spuren wurden für 24 Stunden bei Zimmertemperatur getrocknet und anschließend bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Das Spurenalter betrug zwischen 8 und 30 Tagen. Zur Portionierung der Spuren wurden mit einer Lochstanze runde Stanzen mit einem Durchmesser von 1,5 mm hergestellt. Drei solcher Stanzen hatten ein Spurtrockengewicht von etwa 0,5 mg.

Die HLA-Phänotypen der Personen, von denen die Blutspuren angelegt wurden, sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: HLA-Phänotypen der Personen von denen
Blutspuren angelegt wurden

Nr.			Nr.		
1	A3,A9	B7,B18	26	A1,A2	B8,B12
2	A1,A2	B18	27	A1,A9	B8
3	A10,Aw31	B5,B14	28	A1,A9	B18,B37
4	A1,A3	Bw35,B37	29	A3,A9	B7,Bw35
5	A2,A3	B8,B15	30	A3,Aw32	B5,B7
6	A2,A3	B17,B18	31	A2,A29	B5,B14
7	A3,A11	B15,Bw35	32	A2	B14,B17
8	A2,A10	B17,B18	33	A1,A28	B5,B37
9	A3,Aw30	B15	34	A2,A9	B27
10	A2	B15,Bw22	35	A1,A2	B7,B37
11	A2,A3	B5	36	A2,A28	B40
12	A2	B8	37	A1,A2	B7
13	A2,A3	B7,B15	38	A2	B12,B27
14	A1,A3	B8,B13	39	A2	B5,B18
15	A1,A2	B8	40	A2,A3	B5,B7
16	A1,A10	B8,Bw22	41	A1,A2	B12,B13
17	A1,A3	B7,B8	42	A2,A28	B5,B40
18	A1,A2	B7,B8	43	A2	B15,Bw35
19	A2,A10	B7,Bw22	44	A2,A3	B15,Bw35
20	A10,A11	Bw22	45	A1,A10	B8,Bw35
21	A2,A11	B7,B15	46	A2,A10	B18,B40
22	A2,A9	B14,B15	47	A9,A11	B5,B15
23	A1,A9	B8,B12	48	A1	B5,B7
24	A9	B7,B40	49	A2,A3	B7,Bw35
25	A2	B5,Bw21	50	A3,A11	B12,B15

2.6. Durchführung der Untersuchungen

2.6.1. Absorptionstest

- a) In sog. Beckman-Tubes (0,4 ml Inhalt) 5 μ l entsprechend Tabelle 2 verdünntes Antiserum vorlegen.
- b) Mit 2 Tropfen Mineralöl überschichten.
- c) 3 Stanzen Blutspur mit einem Gesamtspurtrockengewicht von 0,5 mg zugeben. Die Gefäße kurz zentrifugieren, damit die Spuren vollständig in das Antiserum eintauchen.
- d) Ca. 16 Stunden bei 4° C inkubieren.
- e) Den Gefäßen je 1 μ l des Antiserums entnehmen und in die beölten Nöpfchen einer Mikrotestkammer einbringen.
- f) 1 μ l Testlymphozytensuspension (1000 - 1500 Zellen/ μ l) der entsprechenden HLA-Spezifität zufügen und 30 min bei 23° C inkubieren.
- g) 5 μ l Kaninchenkomplement zugeben und 60 min bei 23° C inkubieren.
- h) Anfärben mit 3 μ l 6 %-igem wässrigen Eosin und fixieren mit 9 μ l 37 %-igem wässrigen Formaldehyd.

2.6.2. Absorptions-Elutionstest, thermisch

- a) In ein Beckman-Tube 10 μ l unverdünntes Antiserum vorlegen.
- b) Mit 2 Tropfen Mineralöl überschichten.
- c) 6 Stanzen Blutspur mit einem Gesamtspurtrockengewicht von 1 mg zugeben. Die Gefäße kurz zentrifugieren, damit die Spuren vollständig in das Antiserum eintauchen.
- d) Inkubation für 60 min bei 37° C (Absorptionsphase).

- e) Einbringen von 250 μ l Hanks-Lösung bei Zimmertemperatur (Waschvorgang).
- f) Vollständiges Absaugen der Flüssigkeit.
- g) Zugabe von 5 μ l Hanks-Tris-Lösung im Verhältnis 1:1.
- h) Inkubation für 60 min bei 62° C im Wasserbad.
- i) Möglichst vollständiges Überführen der noch warmen Flüssigkeit aus dem Beckman-Tube in ein Nöpfchen der Mikrotestkammer.
- j) 1 μ l Testlymphozytensuspension (1000-1500 Zellen/ μ l) der entsprechenden HLA-Spezifität zufügen und 60 min bei 37° C inkubieren.
- k) 10 μ l Kaninchenkomplement zugeben und 180 min bei 23° C inkubieren.
- l) Anfärben mit 3 μ l 6 %-igem wässrigen Eosin und fixieren mit 9 μ l 37 %-igem wässrigen Formaldehyd.

2.6.3. Absorptions-Elutionstest, Säure

- a) In ein Beckman-Tube 10 μ l unverdünntes Antiserum vorlegen.
- b) Mit 2 Tropfen Mineralöl überschichten.
- c) 6 Stanzen Blutspur Mit einem Gesamspurtrockengewicht von 1 mg zugeben. Die Gefäße kurz zentrifugieren, damit die Spuren vollständig in das Antiserum eintauchen.
- d) Inkubation für 60 min bei 37° C (absorptionsphase).
- e) Einbringen von 250 μ l Hanks-Lösung bei Zimmertemperatur (Waschvorgang).
- f) Vollständiges Absaugen der Flüssigkeit.
- g) Zugabe von 4 μ l Säure mit pH 3 und Inkubation für 10 min bei Zimmertemperatur.
- h) Vollständiges Entfernen der Spur.
- i) Zugabe von 1 μ l Tris-Lösung mit pH 7,4.

- j) Möglichst vollständiges Überführen der Flüssigkeit aus dem Beckman-Tube in ein Nöpfchen der Mikrotest-kammer.
- k) 1 μ l Testlymphozytensuspension (1000-1500 Zellen/ μ l) der entsprechenden HLA-Spezifität zufügen und 60 min bei 37° C inkubieren.
- l) 10 μ l Kaninchenkomplement zugeben und 180 min bei 23° C inkubieren.
- m) Anfärben mit 3 μ l 6 %-igem wässrigen Eosin und fixieren mit 9 μ l 37 %-igem wässrigen Formaldehyd.

2.6.4. Ablesen

Bei der Ablesung im umgekehrten Phasenkontrastmikroskop wurde die Zahl der lysierten Zellen auf 10 % genau geschätzt (Bewertungsstufen zwischen 0 und 10). Dabei wurde nicht nur darauf geachtet, daß die Zellen eindeutig gefärbt sind, sondern es wurden auch schon gering gefärbte "Übergangsstadien" als positiv bewertet.

3. Ergebnisse

Für jedes Antigen einer Spur wurden die Bewertungen der Reaktionen mit den vier Seren addiert und als "Zytolysegrad" angegeben. Theoretisch wären kumulative Zytolysegrade zwischen 0 und 40 möglich gewesen.

Vom Prinzip her wird beim Absorptionstest das Vorhandensein eines Antigens durch einen niedrigen Zytolysegrad angezeigt, während beim Absorptions-Elutionstest ein hoher Zytolysegrad das Vorliegen eines Antigens angibt.

In den Abbildungen 3 bis 8 sind die Ergebnisse aller Untersuchungen graphisch dargestellt.

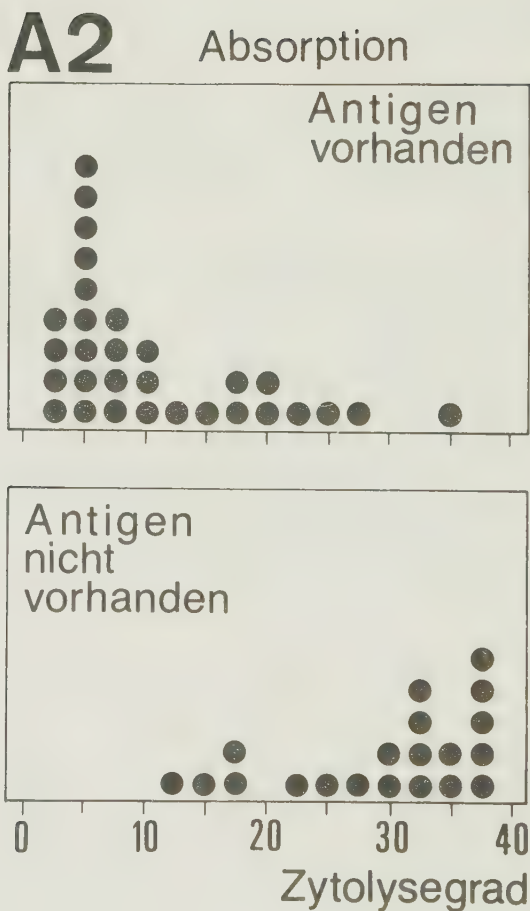


Abbildung 3 : Versuchsergebnisse

Jeder Punkt stellt die Summe der Reaktionen einer Spur mit vier Antisera der Spezifität HLA-A2 dar

A2 Absorption Elution (thermisch)

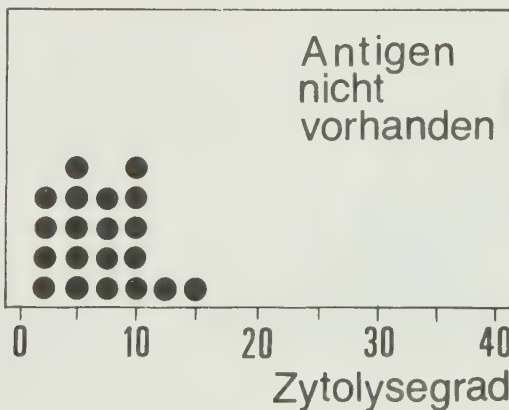
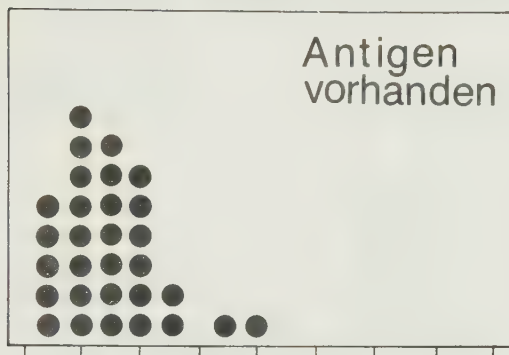


Abbildung 4 : Versuchsergebnisse
Jeder Punkt stellt die Summe der
Reaktionen einer Spur mit vier Anti-
seren der Spezifität HLA-A2 dar

A2 Absorption- Elution (Säure)

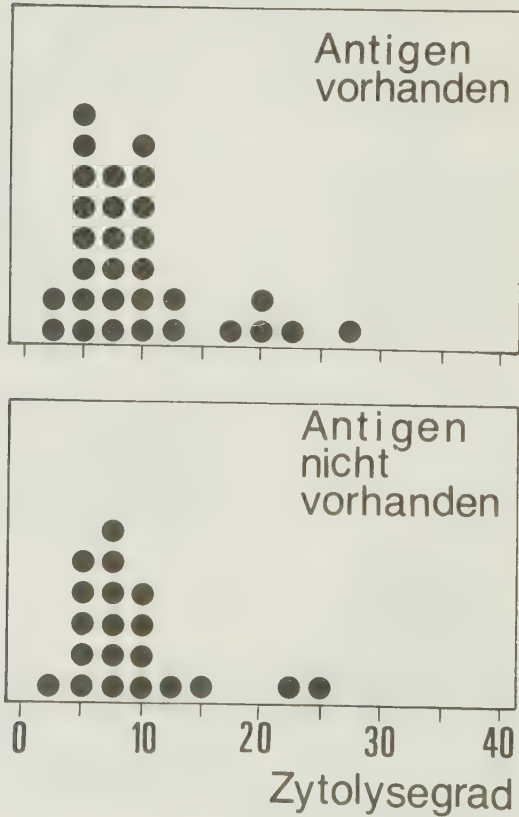


Abbildung 5 : Versuchsergebnisse
Jeder Punkt stellt die Summe der
Reaktionen einer Spur mit vier Anti-
seren der Spezifität HLA-A2 dar

B8

Absorption

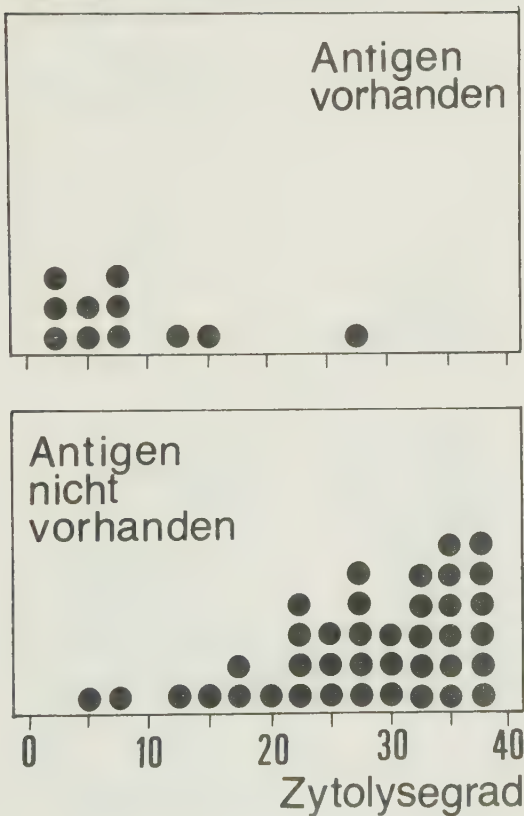


Abbildung 6 : Versuchsergebnisse
 Jeder Punkt stellt die Summe der
 Reaktionen einer Spur mit vier Anti-
 seren der Spezifität HLA-B8 dar

B8 Absorption Elution (thermisch)

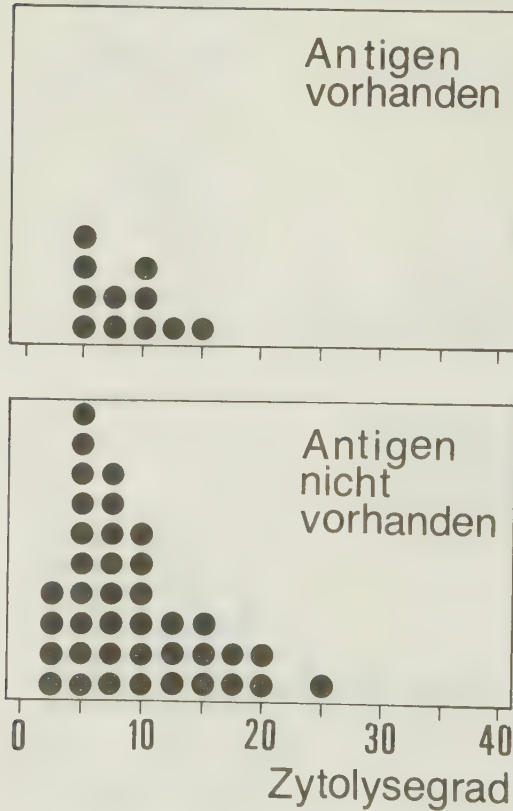


Abbildung 7 : Versuchsergebnisse
Jeder Punkt stellt die Summe der
Reaktionen einer Spur mit vier Anti-
seren der Spezifität HLA-B8 dar

B8

Absorption-
Elution (Säure)

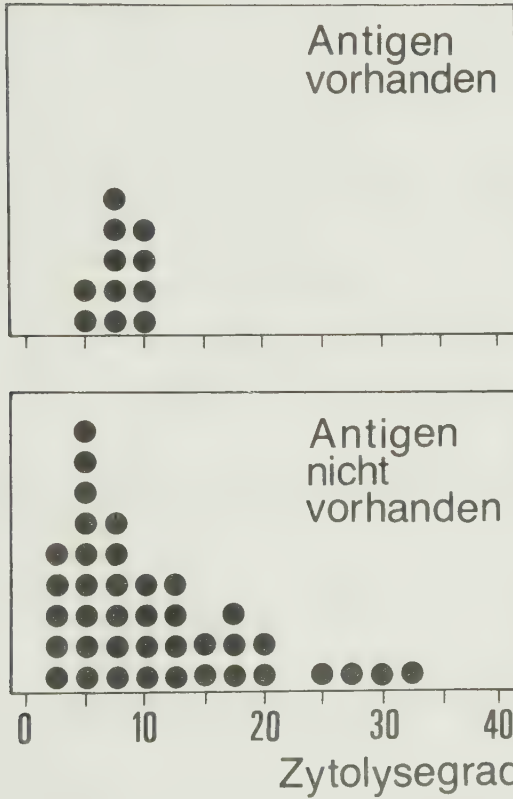


Abbildung 8: Jeder Punkt stellt die Summe der Reaktionen einer Spur mit vier Antisera der Spezifität HLA-B8 dar

4. Diskussion

Die Ergebnisse der Absorptionsuntersuchungen zeigen, daß eine recht gute Differenzierung zwischen Spuren, die das Antigen tragen und solchen, die es nicht aufweisen, möglich ist. In dieser Arbeit waren die Antiseren nicht so sehr auf ihre Eignung für den Absorptionstest, als vielmehr auf ihre Reaktionsweise für das Absorptions-Elutionsverfahren ausgewählt worden. Deswegen waren die Ergebnisse der Voruntersucher (DÖRR, 1982 und KUTZ, 1982) besser gewesen als die Resultate der vorliegenden Absorptionsuntersuchungen. Auch erscheint es wahrscheinlich, daß bei Anwendung von mehr als vier Antiseren die Ergebnisse der Absorptionsuntersuchungen besser ausgefallen wären.

Keine der beiden Absorptions-Elutionsmethoden zeigte befriedigende Ergebnisse. Der Grund dafür ist wahrscheinlich die zu geringe Besetzung der Blutspur mit HLA-Antigenen, so daß keine ausreichende Zahl von Antikörpern vorübergehend angelagert werden kann. Geht man davon aus, daß im peripheren Blut vorwiegend die Thrombozyten die Träger der HLA-Antigene sind, dann errechnen sich für 1 μ l Vollblut ca. 2×10^9 HLA-Antigene (zur Berechnung wurden 1×10^4 Antigeterminanten je Thrombozyt und 2×10^5 Thrombozyten je μ l Blut zugrunde gelegt). In 1 mg Blutspur ständen demnach maximal 8×10^9 HLA-Antigene zur Verfügung. In einer Blutspur gleicher Größe stehen für die Untersuchung der Antigene des ABO-Systems immerhin etwa 8×10^{12} Antigene, also tausendmal so viel zur Verfügung.

Im klassischen Absorptionstest nach HOLZER wird durch diese Spurenmenge ein Anti-A Serum z.B. von einem Titer von 1:64 auf einen Titer von 1:4, also um vier Stufen, reduziert. Beim Absorptionstest zum Nachweis von HLA-Antigenen wird im allgemeinen ein Antiserum mit dem Titer von 1:1 vollständig oder fast vollständig absorbiert. Die Titerreduktion beträgt also nur eine Stufe. Auch diese Überlegung zeigt, daß die Besetzung einer Spur mit HLA-Antigenen wesentlich geringer ist als mit ABO-Antigenen. Diese Tatsache ist als Grund für das Mißlingen der Absorptions-Elutionsuntersuchungen anzusehen.

Allerdings war bei den Absorptions-Elutionsmethoden die geringe Antigendichte auf den Blutspuren schon so weit wie möglich berücksichtigt worden:

- a) Die Ausgangsmenge des Antiserums betrug 10 μ l und der gebundene Antikörper wurde in nur 5 μ l eluiert.
- b) Zu 4 μ l Eluat wurden ca. 1000 Testzellen in nur 1 μ l Flüssigkeit gegeben.
- c) Durch Erhöhung der Antigen-Antikörper-Reaktionszeit auf 60 min bei einer Temperatur von 37° C wurde eine bessere "Ausnützung" der verfügbaren Antikörper erreicht.
- d) Die Komplementeinwirkungszeit wurde auf das Dreifache der üblichen Zeit verlängert.

Trotzdem waren keine positiven Ergebnisse zu erzielen.

Die Empfindlichkeit von Testlymphozyten für die Erfassung von HLA-Antikörpern, die nur in sehr geringer Menge vorliegen, kann mit Routinemethoden der HLA-Bestimmung aber nicht mehr gesteigert werden. Der Einsatz größerer Spurenmengen ist für die praktische Anwendbarkeit des Tests nicht sinnvoll. Deshalb scheinen Absorptions-Elutionsmethoden für die HLA-Typisierung von Blutspuren auch nach Optimierung des Untersuchungsablaufs nicht geeignet zu sein.

Es sollten daher weitere Anstrengungen unternommen werden, den Absorptionstest zur HLA-Typisierung von Blutspuren so zu vervollkommen, daß er für Routineuntersuchungen anwendbar wird.

5. Zusammenfassung

Zur weiteren Differenzierung von Blutspuren im kriminaltechnischen Bereich wurden in den letzten Jahren auch Versuche, das HLA-System einzubeziehen, unternommen.

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob durch ein Absorptions-Elutionsverfahren bessere Ergebnisse als mit den bisher durchgeführten Absorptionsuntersuchungen (RITTNER und WAIYAWUTH, 1974; HODGE et al., 1979; NEWALL, 1979; DÖRR, 1982; KUTZ, 1982) erzielt werden könnten. Die Antigene HLA-A2 und -B8 wurden dabei mit jeweils vier verschiedenen Antiseren untersucht.

Für den Absorptions-Elutionstest wurden zu 10 µl unverdünntem Antiserum 1 mg Blutspur gegeben und für 60 min bei 37° C inkubiert. Anschließend erfolgte der Waschvorgang mit 250 µl Hanks-Lösung und danach das vollständige Absaugen der Flüssigkeit. Nun wurden entweder 5 µl Hank-Tris-Lösung (1:1) zugegeben und für 60 min bei 62° C inkubiert (Absorption-Elution, thermisch) oder 4 µl Säure mit pH 3 zugegeben und für 10 min bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend mit 1 µl Tris-Lösung (pH 7,4) neutralisiert (Absorption-Elution, Säure). Dann wurde jeweils die gesamte Flüssigkeit auf eine Mikrottestplatte gebracht und 1 µl Testlymphozytensuspension zugegeben und für 60 min bei 37° C inkubiert. Danach wurden 10 µl Kaninchenkomplement eingebracht und für 180 min bei 23° C inkubiert. Der weitere Untersuchungsablauf entsprach dem NIH-Test.

Der vergleichende Absorptionstest wurde nach den Methoden von HODGE et al. (1979) durchgeführt: Zu 5 µl entsprechend austitriertem Antiserum wurden 0,5 mg Blutspur gegeben. Nach 14stündiger Inkubation bei 4° C wurde 1 µl des Antiserums in eine Mikrottestplatte gebracht, 1 µl Testlymphozytensuspension zugegeben und anschließend ein NIH-Test durchgeführt.

Es wurden 50 verschiedene Blutspuren untersucht. Beim Absorptionstest war eine recht gute Differenzierung zwischen Spuren, die das Antigen tragen und solchen, die es nicht aufweisen, möglich, während bei den Absorptions-Elutionsverfahren keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden konnten. Der Grund dafür

scheint in der geringen Besetzung der Spur mit HLA-Antigenen zu liegen, weshalb nicht genügend Antikörper vorübergehend angelagert werden können.

Deshalb sollten sich die weiteren Untersuchungen der Verbesserung des Absorptionstests zuwenden.

6. Literatur

- Albert ED, Scholz S, Bertrams J, Ewald RW, Westphal E, Ratschko KW, Spielmann W, Seidl S (1975)
Representative HL-A phenotype and haplotype frequencies of the German population.
Z. Immunol. Forsch. 148: 367-371
- Bender K (1978)
Das HLA-System
Broschüre des BIOTEST-Serum Instituts GmbH
- Dörr HM (1982)
Zur HLA-Typisierung von Blutspuren - Untersuchungen mit einem Absorptionstest.
Med. Diss. Erlangen
- Hayward JW, Bosworth AL (1975)
Esterase D-Typen in menschlichen Blutflecken
J. forens. Sci. Soc. 15: 289-291
- Hodge D, Festenstein H, Wolf E, Lincoln R, Dodd B (1979)
Results from a preliminary Study of the detection of HLA antigens in blood stains.
Referate der 8. internationalen Tagung der Gesellschaft für forens. Blutgruppenkunde e.V. 175-182
- Holzer F (1931)
Ein einfaches Verfahren zur Gruppenbestimmung an vertrocknetem Blut durch Agglutininbindung.
Z. gerichtl. Med. 16: 445-458
- Howard HD, Martin PD (1969)
An improved method for ABO and MN grouping of dried bloodstains using cellulose acetate sheets.
J. forens. Sci. Soc. 9: 28-30
- Hummel K, Sistig H, Volk P (1977)
Zeitliche Dauer der Typisierbarkeit erythrozytärer Enzyme (acP, GLO I, PGM 1, GPT, AK) in Blutspuren - an Leinen angetrocknet in Abhängigkeit von der Aufbewahrungstemperatur (RT, 4°, -20°, -180° C).
Referate der 7. internationalen Tagung der Gesellschaft für forens. Blutgruppenkunde e.V. 405-406

- Jorch G, Oepen I (1977)
Nachweis der Faktoren Gm (1, 2, 4, 5, 21) und
InV (1) in menschlichen Sekreten: Speichel,
Schweiß, Nasensekret und Sperma.
Z. Rechtsmed. 79: 1-6
- Kutz N (1982)
Zur HLA-Typisierung von Blutspuren mit einem
Absorptionstest
Med. Diss. Erlangen
- Landsteiner K (1901)
Über Agglutinationserscheinungen normalen mensch-
lichen Blutes.
Wien. Klin. Woch. 14: 1132-1134
- Lattes L (1926/1927)
Praktische Erfahrungen über Blutgruppenbestimmung
in Flecken.
Z. gerichtl. Med. 9: 402-410
- Lötterle J (1981)
HLA-Typisierung von Blutspuren. Untersuchungen
mit einem Absorptionstest.
Z. Rechtsmed. 87: 217-224
- Martin PD (1977)
A manual method for the detection of Rh antigens
in dried bloodstains.
J. forens. Sci. Soc. 17: 139-142
- Mayr WR (1977)
Probleme bei der Anwendung des HLA-Systems im
Vaterschaftsgutachten.
Referate der 7. internationalen Tagung der Gesell-
schaft für forens. Blutgruppenkunde e.V. 417-441
- Miscicka D, Dobosz T, Raszeja S (1977)
Determination of phenotypes of phosphoglucomutase
(PGM 1) in bloodstains by cellulose acetate
electrophoresis.
Z. Rechtsmed. 79: 297-300

Mueller-Eckhardt C (1972)

Studies on cross reactive HL-A antibodies by
elution with platelets.

Tissue Antigens 2: 436-446

Newall P (1979)

The identification of HLA-A2 and HLA-B5 antigens
in dried bloodstains.

Can. Soc. Forens. Sci. J. 12: 1-15

Pereira M (1963)

The identification of MN grouping of dried blood-
stains.

Medicine Sci. Law 3: 263-271

Rittner C, Waiyawuth V (1974)

HL-A typing in dried bloodstains. I. Specificity
and reliability of the inhibition test.

J. Immunogenet. 1: 99-111

Rittner C, Waiyawuth V (1975)

HL-A typing in dried bloodstains. II. Comparative
studies on microcytotoxicity and microcomplement
fixation test.

J. Immunogenet. 2: 211-222

Rothwell TJ, Sayce J (1974)

The stability of PGM and Ak isoenzymes in human
tissues.

J. forens. Sci. Soc. 19: 590-598

Schwerd W (1977)

Zum Beweiswert der MN-Differenzierung aus Blut-
spuren.

Referate der 7. internationalen Tagung der Gesell-
schaft für forens. Blutgruppenkunde e.V. 335

Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling bin ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes an seinem Institut, die Durchsicht der Arbeit sowie für die Übernahme des Referates außerordentlich zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. J. Lötterle danke ich für die Überlassung des Themas und seine tatkräftige und stets gern gewährte Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten.

7. Lebenslauf

Am 20. August 1950 wurde ich als erstes von drei Kindern der Eheleute Otto Hofmann, Verkehrsunternehmer, und Lucia Hofmann, geb. Peter in Geiselbach geboren.

Nach der Volksschule in Mömbris-Brücken besuchte ich das Friedrich-Dessauer-Gymnasium in Aschaffenburg und danach das Staatliche Gymnasium in Marktbreit, wo ich im Juni 1971 die Reifeprüfung bestand.

Nach abgeleistetem Grundwehrdienst studierte ich zunächst Wirtschaftswissenschaften und Geographie an der Universität Würzburg. Im Sommersemester 1976 begann ich an der Universität Kiel mit dem Studium der Zahnmedizin. Nach dem Physikum wechselte ich an die Universität Erlangen-Nürnberg und legte hier im Frühjahr 1981 das Staatsexamen ab.

Seit Oktober 1981 bin ich als Assistent bei einem Zahnarzt in freier Praxis beschäftigt.

